

VU Research Portal

Fluxes of Life

Binsl, T.W.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Binsl, T. W. (2011). *Fluxes of Life: Bioinformatics for Metabolic Flux Quantification in Isotopic Non-Steady-State*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Stromen van het leven: Bioinformatica voor het kwantificeren van metabole fluxen

Over fluxomics

Het leven is een continu proces van adaptatie aan nieuwe omgevingsomstandigheden en vraagt voortdurend om de juiste aanpassingen te maken en er op die manier voor te zorgen dat een levensvorm blijft voortbestaan. Een duidelijk voorbeeld van dergelijke dynamische veranderingen komt tot uitdrukking in de stofwisseling van alle levende organismen.

De stofwisseling kan worden omschreven als het totale spectrum van biochemische reacties. Vanuit een kwalitatief oogpunt is hier zowel bij micro-organismen als bij hogere organismen veel over bekend. Desalniettemin is er een groot gebrek aan kennis betreft de kwantitatieve metabole parameters hoewel deze juist essentieel zijn om inzicht te krijgen in complexe metabole systemen onder alle omstandigheden. Het ontbreken van deze parameters vormt een grote hindernis bij het modelleren en begrijpen van de stofwisseling van mensen, dieren en organismen in het algemeen. Om deze reden zijn dit proefschrift en vier jaar promotieonderzoek gewijd aan 'fluxomics', een discipline die ernaar streeft de dynamische stroom van massa tussen metabolieten te begrijpen met als doel de lacunes in onze kennis op te vullen.

Fluxomics studies zijn zeer complex en gaan gepaard met tal van knelpunten zoals niet-intuïtieve wiskundige modellen of situaties waarbij de experimentele uitvoering gecompliceerd is. Dit proefschrift draagt oplossingen aan om een aantal van deze hindernissen weg te nemen en deze worden hieronder uitvoerig besproken. Tenslotte worden de toekomstige ontwikkeling op het gebied van fluxomics beschreven alsmede de mogelijke toepassingen bij medische diagnoses.

Experimentalisten modelleren in een 'slordige' parameter ruimte

In sommige gevallen kan er een grote divergentie optreden tussen modellenbouwers en experimentalisten inzake de kennis over wiskundige- en computermodellen. Zo kunnen bijvoorbeeld computermodellen die beogen de distributies van isotopen en metabole fluxen (stromen) te simuleren zeer complex in elkaar steken en er toe leiden dat experimentalisten er voor terug deinzen om hun gegevens op een verfijnde wijze te analyseren. Om deze kloof te overbruggen en metabole modellen op een meer intuïtieve manier op te bouwen en te simuleren zijn er twee computerprogramma's ontwikkeld genaamd FluxSimulator en FluxSimulator^{CPN}, welke worden beschreven in hoofdstuk 2 en 3 van dit proefschrift.

Algemene implementaties van metabole modellen gebruiken doorgaans standaard differentiaalvergelijkingen voor het simuleren van de tijdsafhankelijke metabole dynamiek. Alhoewel standaard differentiaalvergelijkingen een geschikt instrument vormen voor het opzetten van dergelijke simulaties, is de implementatie in een leesbaar computerformaat foutgevoelig, inflexibel en praktisch niet uitvoerbaar voor mensen zonder ervaring op dit gebied. Om deze reden heeft het programma FluxSimulator (hoofdstuk 2) een gebruiksvriendelijke opzet en kunnen metabole routes gemakkelijk worden gespecificeerd in drie tekstbestanden. Hierna wordt het gehele stelsel van differentiaalvergelijkingen automatisch samengevoegd en gesimuleerd.

De flexibele manier waarop men via FluxSimulator een model kan bouwen wordt vervolgens gebruikt om distributies van isotopen in een metabolisch model te simuleren. Tenslotte zijn de resultaten vergeleken met een uitvoering van hetzelfde model met behulp van de modellering software Berkeley Madonna. Beide simulaties laten identiek dynamisch gedrag zien. Echter, in tegenstelling tot Berkeley Madonna, is FluxSimulator geschikt voor een breder publiek met inbegrip van onderzoekers die een meer experimentele dan wiskundige achtergrond hebben.

Alhoewel FluxSimulator een makkelijkere opstap vormt voor experimenteel-wetenschappelijke onderzoekers om hun modellen te bouwen, sluit de aanpak wellicht nog niet helemaal aan op hun intuïtie en is het programma derhalve nog niet aantrekkelijk genoeg. Derhalve is er een tweede programma ontwikkeld, genaamd FluxSimulator^{CPN} (hoofdstuk 3), dat door middel van Petri netten gebruik maakt van een meer grafische aanpak. Petri netten lijken qua structuur en functie sterk op de metabole modellen die ze vertegenwoordigen en zijn in veel gevallen nauwkeurig genoeg om de biologische context te kunnen simuleren.

Met behulp van FluxSimulator^{CPN} is een metabolisch testmodel alsmede een model van de citroenzuurcyclus (TCA cyclus) gesimuleerd. Deze simulatie is uitgevoerd zowel met de 'discrete' als de 'continue' gekleurde Petri net weergave. Daarnaast zijn beide modellen gesimuleerd met FluxSimulator welke als referentie dient. Uit gemaakte simulaties bleek dat de verschillende aanpakken overeenkwamen. In het geval van continue Petri netten is dit geen verrassing aangezien zij kunnen worden gezien als een grafische weergave van standaard differentiaalvergelijkingen, waarbij de simulaties een integratie van gewone differentiaalvergelijkingen volgens de Euler methode voorstellen. Gekleurde Petri netten maken het daarentegen mogelijk om met

virtuele moleculen te werken, welke worden gerepresenteerd door ‘tokens’. Hierdoor wordt de aanpak minder abstract in vergelijking met benaderingen met standaard differentiaalvergelijkingen en is daardoor meer intuïtief voor experimentatoren.

Beide simulatieprogramma's (FluxSimulator en FluxSimulator^{CPN}) bieden de mogelijkheid om isotopen distributies in metabole modellen op een flexibele en intuïtieve manier te implementeren en te simuleren. Om die reden zijn ze zeer geschikt om parameter combinaties, indien veranderd op een gecorreleerde manier, te bepalen die een groot effect (‘stijve’ parameter richting) dan wel een zeer klein effect (‘slordige’ parameter richting) op de modelvoorspellingen hebben. Door het simuleren van een collectie van parameter combinaties is het zodoende mogelijk om te bepalen welke parameters nauwkeurig en welke onnauwkeurig geschat kunnen worden.

Flux kwantificering onder moeilijke omstandigheden

Het kwantificeren van fluxen is een lastige taak en de kwaliteit van de gekwantificeerde flux-waardes is zeer afhankelijk van de beschikbare experimentele gegevens. In de afgelopen jaren zijn er veel fluxomics toepassingen gemaakt voor diverse experimentele settings, waaronder metabole en isotopische evenwichtstoestanden. Dit houdt in dat de concentraties en de isotopische composities van de metabolieten met verloop van tijd niet veranderen. Helaas vereist het benaderen van evenwichtstoestanden lange experimenten en vraagt het bijgevolg ook een grote hoeveelheid met isotopen gelabeld substraat zodat experimenten duur worden. Bovendien is het niet altijd haalbaar om evenwichtsstadia van zoogdiersystemen in een experiment te onderzoeken, aangezien dit soort stadia meestal zeer kort duren. Een ander probleem dat zich voordoet bij het opstellen van zoogdiermodellen is het feit dat het in veel gevallen onmogelijk blijkt om tijdreeksen te meten.

Om toch een flux kwantificering mogelijk te maken in het geval van niet-stabiele isotopen, waarbij niet kan worden beschikt over tijdreeksen, is het flux simulatie- en schattingsprogramma FluxEs ontwikkeld (hoofdstuk 4). In het bijzonder is FluxEs in staat om schattingen te maken van fluxen in monsters van één enkel weefsel dat niet in een isotopische evenwichtstoestand verkeerd. FluxEs is getest door middel van de kwantificering van aërobe metabole fluxen, bijvoorbeeld de fluxen van de tricarboxylische zuur (TCA) cyclus, waarbij multipletten van kernspinresonanties (NMR) zijn gemeten in varkenshart monsters. De varkens zijn verdeeld in een controle groep en een groep waarbij een cardiale stress is geïnduceerd. Aangezien het zuurstofverbruik gekoppeld is aan de TCA cyclus was het mogelijk om de flux kwantificeringen te vergelijken met het zuurstofverbruik van de hartspeer hetgeen gekwantificeerd was door middel van bloedgas en bloedstroom metingen.

De met FluxEs gekwantificeerde fluxen weerspiegelden zelfs bij gelijke experimentele omstandigheden de verwachte individuele verschillen in de energiestofwisseling van varkens. Bovendien kon er in elk afzonderlijk hart een ruimtelijke variatie in de stofwisseling waargenomen worden. Deze variatie was ook eerder aangetroffen op het niveau van zowel de enzymactiviteiten van de TCA cyclus alsmede de toevoer van zuurstofrijk bloed. Het zuurstofverbruik, berekend via de metabole fluxen en

gemeten uit het bloedgas, laten een sterke correlatie zien. Verder was de hogere werklast in de groep met cardiale stress duidelijk te zien door zowel een toename van de TCA cyclus flux en een hoger zuurstofverbruik.

Net zoals FluxSimulator biedt FluxEs een intuïtief invoerformaat voor het bouwen van modellen die gebaseerd zijn op een wiskundige voorstellingswijze. Dit maakt FluxEs toepasbaar op een brede waaier van metabole systemen. Daarnaast zorgt de automatische flux kwantificering ervoor dat het programma eenvoudig te gebruiken is voor wetenschappers die niet vertrouwd zijn met het programmeren van computer-programmas.

De unieke mogelijkheden van FluxEs worden gedemonstreerd in een studie naar varkens in een septische shock-achtige toestand, een model dat lijkt op de menselijke septische shock met hypotensie (hoofdstuk 5). Door middel van een computeranalyse met FluxEs was het mogelijk een verband tussen afnemende globale hart functie zoals een mismatch tussen noodzakelijker en regionale, linker ventrikel zuurstof levering te ontdekken. De extra dosis zuurstof die nodig is voor de excitatie-contractie koppeling kan zowel bijdragen aan de daling van de globale functie als mede de handhaving van de globale coronaire bloedstroom, die veroorzaakt wordt door de globale metabole autoregulatie. Dit maakt het mogelijk om conclusies te trekken over de oorzaken en de gevolgen van de systolische disfunctie van de hartspeer, hetgeen kenmerkend is voor de menselijke septische shock.

Flux kwantificering onder nog moeilijkere omstandigheden

Het uitvoeren van experimenten in een metabole evenwichtstoestand is niet altijd haalbaar en de steeds veranderende concentraties van de metabolieten creëert problemen bij de computationele kwantificering van metabole fluxen. De kwantificering van metabole fluxen kan succesvol zijn als de veranderingen van de interne metaboliet concentraties bekend zijn en door de tijd heen metingen zijn verricht naar de gelabelde incorporatie van belangrijke metabolieten. Echter, indien dergelijke datasets ontbreken, is het moeilijk om betrouwbare schattingen te maken van fluxen.

Hoofdstuk 6 beschrijft een methode om fluxen te analyseren en met als toepassing een complex model van standaard differentiaalvergelijkingen van de stofwisseling van de humane fecale microbiota. De experimentele gegevens van de metabole en isotopische niet-stabiele toestanden zijn verkregen door het TNO *in vitro* model van het menselijk colon (TIM-2), welke het proximale colon simuleert.

De analyse maakte het mogelijk om relatieve flux-verdeling van vier belangrijke routes in het metabole model te bepalen. Dit toont aan dat het mogelijk is om fluxen te bepalen, zelfs in situaties waarbij er weinig kennis is over de dynamische veranderingen van de natuurlijke metaboliet-concentraties. De proefopzet en de analyse van de resultaten stellen het in staat om tijdopgeloste effecten van voedingsstoffen op de flux distributie in humane fecala microbiota te bepalen. Indien echter schattingen en precisie van parameters in de toekomst verbeterd moet worden, is het een vereiste om gebruik te maken van ontwerp-principes voor instationaire ^{13}C experimenten.

Toekomstige richtingen van fluxomics

Om complexe metabole systemen zo goed mogelijk te kunnen analyseren, is het meest zinvol als men grote netwerken verdeelt in modules die afzonderlijk van elkaar conceptueel en experimenteel in detail te bestuderen zijn. Modellen, zoals de koolstof-transitie netwerken beschreven in dit proefschrift, zijn meestal onderdeel van een groter systeem. Als de fluxen binnenin een bepaalde route sterk domineren over de fluxen die het traject binnenkomen en uitgaan via zijpaden, dan is het mogelijk om dit model als een module te bestuderen. Het is waarschijnlijk wel moeilijk om metabole systemen volledig te verdelen in modules die onafhankelijk van elkaar kunnen worden bestudeerd, aangezien metabole routes veelal met elkaar overlappen en interacteren. Indien het echter mogelijk is om een onafhankelijk deel van het systeem te bestuderen, is het ook mogelijk om de functie van dat onderdeel nauwkeurig te beschrijven. Door de verschillende modules aan elkaar te koppelen is het dan mogelijk om een geheel van het systeem te maken en dit zou de ideale strategie zijn om een groot systeem te onderzoeken.

Gezien het feit dat er zoveel informatie beschikbaar is over de connectiviteit van de stofwisseling, kan de vraag gesteld worden of de tijd niet rijp is om te beginnen met het opbouwen van kwantitatieve en dynamische modellen van de humane en dierlijke stofwisseling. Het geleidelijke opbouwen, door proefondervindelijk leren, van een meer begrijpelijk menselijk stofwisselingssysteem kan er toe bijdragen om de enorme hoeveelheid experimentele gegevens van menselijke en dierlijke stofwisselingen te integreren en te begrijpen. Het bouwen van een valide model zal alleen mogelijk zijn door fluxen te voorspellen op basis van nieuwe experimentele gegevens en hierna modellen te corrigeren indien de voorspellingen onjuist blijken te zijn. Op deze manier kunnen dynamische modellen van de stofwisseling, die vele metabolieten en routes herbergen, hun waarde tonen bij de integratie van de uitgebreide kennis over duizenden metabolieten. Dit alles wordt nog belangrijker wanneer het gedrag van het metabole systeem wordt geanalyseerd en voorspeld tijdens een ziekteproces of een therapeutische interventie. Omdat het ontwikkelen van stofwisseling modellen van mens en dier een uitdaging is die onvermijdelijk moet worden aangegaan, is er een behoefte om te kunnen gaan met de grote omvang van systemen en in het bijzonder met grote aantal kinetische parameters die niet nauwkeurig bekend zijn.

Een mogelijkheid om onnauwkeurig bekende parameters aan te pakken, is de toepassing van gezamenlijke simulaties om zodoende de waarschijnlijke reikwijdte van parameters te verkennen. Om deze reden is er een groot aantal simulaties uitgevoerd met verschillende parameter settings welke waarschijnlijk een substantieel deel van de multidimensionale parameterruimte beslaan maar waarbij ook de correlatie tussen de parameters wordt meegenomen. Belangrijk is dat deze simulaties ook gebruikt kunnen worden om het effect van meetfouten te onderzoeken op basis van het betrouwbaarheidsinterval van de afgeschatte parameters uit experimentele gegevens.

Nog een andere mogelijkheid om de kennis over kinetische parameters te verbeteren zou de toepassing van analyse op meerdere schaalniveaus kunnen zijn. Dit betekent dat de metingen op verschillende aggregatieniveaus worden meegenomen. Zo zouden

bijvoorbeeld niet alleen eigenschappen van de enzymen of geïsoleerde mitochondria kunnen worden opgenomen in een analyse, maar ook de gemeten respons van een hele route of netwerk van aan elkaar verbonden enzymen en organellen in de cel. Vanuit een experimenteel oogpunt kan dit worden bereikt door het tijdsverloop te meten van de aanpassing aan de gewijzigde cellulaire werkbelastingen, zoals de toegenomen frequentie van de spiercontractie, het neurale vuren of de secretie van hormonen. Een ander voorbeeld is het meten van metabole fluxen in specifieke routes bij verschillende evenwichtstoestanden in verhouding tot de metaboliet concentraties in de route.

Er moet wel voor worden opgepast dat het model van de metabole route en de koolstof distributieroutes compatibel zijn met het onderzochte orgaan en celtype. Het model voor de hartstudies gebruikt in hoofdstuk 4 en 5 is met name ontworpen en getest voor de *in vivo* benaderde hartspier. Hoewel de metabole routes van de TCA-cyclus, en de daarmee samenhangende aminozuren die zijn opgenomen in dit model, bijna universeel aanwezig zijn in andere organen en celtypen, varieert de activiteit de verscheidene anaplerotische routes bij verschillende experimentele settings. Derhalve moeten modellen van metabole routes en koolstof-distributies worden aangepast om op die manier het onderzochte celtype zo nauwkeurig mogelijk te weerspiegelen. Het is opportuun om de geschiktheid van modellen waarmee nauwkeurig metabole fluxen worden gekwantificeerd, te beoordelen per afzonderlijk orgaan en celtype.

Een cruciaal aspect is dat de organisatie van het modelleer-proces op een zodanige wijze plaatsvindt dat, ook indien er onvermijdelijke fouten worden gemaakt in de eerste versies van het model, het samenspel tussen de computer en experimentele tests resulteert in een geleidelijke verbetering van het model. We moeten ernaar streven het modelleren van processen de drijvende kracht achter metabole experimenten en het verzamelen van data te maken. Op deze manier zal dit de drager worden van de integratie van kennis en het begrijpen van complete metabole systemen.

Fluxomics en medicijnontwikkeling

De mate waarin energie wordt geproduceerd in het hart weerspiegelt zijn gezondheid en het vermogen om bloed te pompen. De energieproductie is evenredig aan het plaatselijke zuurstofverbruik die verbonden is aan de aërobe stofwisseling van vet-zuren of koolhydraten. Als bij hart- en vaatziekten de bloeddoorstroming en daarmee de zuurstof levering is verlaagd, wordt de pompcapaciteit van het hart bedreigd en ontwikkeld zich de ischemische hartziekte (IHD).

De IHD is de belangrijkste doodsoorzaak in de westerse wereld. Ter illustratie, alleen in de Verenigde Staten al schat men dat het aantal patiënten met stabiele angina in totaal 16.5 miljoen bedraagt. Vanwege de prevalentie van IHD en de daarmee verbonden ziekte- en sterftcijfers bestaat er een grote behoefte aan nieuwe effectieve geneesmiddelen. Dit wordt ook onderstreept door de honderden klinische proeven die gaande zijn om deze farmaceutische interventies te ontwikkelen. Desalniettemin vormen de lage slagingskansen van potentiële geneesmiddelen in klinische proeven en de bijbehorende kosten een grote belemmering in het ontwikkelingsproces van geneesmiddelen. Om die reden is het van grote waarde voor een farmaceutisch bedrijf

om ineffectieve kandidaat-geneesmiddelen al in een vroeg stadium van het ontdekkings- en ontwikkelingsproces te detecteren.

Bij IHD worden meestal kleine gebieden in het hart veel harder geraakt dan de rest van het hart. In deze zwaar getroffen gebieden kunnen veel cellen afsterven en kunnen ook hartritmestoornissen en pijn op de borst worden veroorzaakt. Een van de belangrijkste therapeutische doelen is het handhaven van de stofwisseling en de energieproductie in deze aandachtsgebieden, ondanks de sterke vermindering van de bloedstroom. Om dit doel te bereiken is het van essentieel belang dat, tijdens de ontwikkeling van geneesmiddelen, metingen kunnen worden verricht naar de energiestofwisseling en het gebruik van vetzuren en koolhydraten in deze kleine gebieden van het hartweefsel.

Om de effectiviteit van potentiële kandidaat-geneesmiddelen te voorspellen moet de energieomzetting in de ischemische gebieden van het hart worden gekwantificeerd. Dat is belangrijk omdat juist dit proces (en niet bijvoorbeeld de cellulaire niveaus van ATP) als eerste wordt beïnvloed in hypoxische weefsels. De experimentele en analytische aanpak beschreven in hoofdstuk 3 van dit proefschrift is in staat om metabole fluxen en energieomzetting te kwantificeren. Dit biedt een unieke gelegenheid om te kijken of de kandidaat-geneesmiddelen een verhoging van de energiestofwisseling te weegbrengen en daarmee ook leiden tot een verbetering van de overlevingskansen en het functioneren van hartcellen die bedreigd worden door ischemie.

Conclusies

Kwantitatieve kennis over metabole parameters is onontbeerlijk voor het modelleren en begrijpen van stofwisseling in levende organismen in hun geheel.

Om die reden is dit promotieonderzoek gewijd aan fluxomics methoden om zo het gat in kennis over kwantitatieve metabole parameters te verkleinen. Twee programma's zijn ontwikkeld om ^{13}C tracer-experimenten te simuleren (FluxSimulator (hoofdstuk 2) en FluxSimulator^{CPN} (hoofdstuk 3)), en deze zijn met succes getest. Beide programma's bieden een andere, doch flexibele en intuïtieve, manier om koolstof isotopen experimenten te implementeren en te simuleren. Dit maakt de complexe wereld van het modelleren toegankelijker voor experimentalisten die veel kennis over de biologie hebben, maar wellicht minder vaardig zijn met complexe wiskundige modellen. Op deze manier kunnen meer betrouwbare biologische modellen worden ontwikkeld.

Toch zijn computerprogramma's die het mogelijk maken ^{13}C tracer-experimenten te simuleren, met behulp van een onderbouwde schatting van metabole parameters, slechts een eerste stap en er wordt met smart gewacht op een computerprogramma dat in staat is om metabole parameters te kwantificeren op basis van experimentele gegevens. Bovendien moet zo een computer programma zodanig worden ontworpen dat het aan de ene kant gemakkelijk te gebruiken is, maar moet het aan de andere kant ook in staat zijn om metabole parameters te kwantificeren onder moeilijke omstandigheden, zoals tijdsmetingen op één enkel moment in metabool-constante maar isotopische onevenwichtstoestanden. Met dit doel voor ogen is het computer-programma FluxEs ontwikkeld en met succes getest door middel van het kwantifi-

ceren van aërobe metabole stromen in varkenshart monsters (hoofdstuk 4). FluxEs is vervolgens ook gebruikt om de gegevens te analyseren van varkensharten onder verdovende omstandigheden. Ter illustratie hiervan is ook een hoofdstuk opgenomen met een studie over een septische shock-achtige toestand (hoofdstuk 5). Deze harten staan model voor de menselijke septische shock met hypotensie en uit de resultaten is gebleken dat een dalende globale hartfunctie in verband met een mismatch van nodige en de geleverde zuurstof in de regionale linker ventrikel samen valt. Zonder het unieke vermogen om in één enkel weefselmonster metabole fluxen te kwantificeren, in niet-isotopische evenwichtstoestanden, zouden dergelijke observaties niet mogelijk zijn.

Het is al een grote uitdaging om metabole parameters te kwantificeren op basis van experimentele gegevens, indien deze zijn verzameld onder metabole evenwichtstoestanden die echter isotopisch onevenwichtig zijn. Maar deze zaken worden nog gecompliceerder als men metabole transiënte omstandigheden behandelt. Hoofdstuk 6 van dit proefschrift beschrijft een aanpak om, bij deze moeilijke condities, metabole parameters in microbiota van menselijke uitwerpselen te kwantificeren en laat zien dat het mogelijk is conclusies te trekken over de metabole flux-distributies.

Concluderend zijn er tijdens dit promotieonderzoek nieuwe fluxomics-methodes voor de kwantificering van metabole parameters onderzocht en ontwikkeld. Deze methodes bieden een solide basis voor toekomstige ontwikkelingen die gericht zijn op het kwantificeren van metabole parameters en helpen om de stofwisseling van organismen, en van het leven in zijn geheel, beter te begrijpen. Zodoende kan fluxomics een belangrijk hulpstuk worden bij de besluitvorming over complexe vragen, zoals de ontwikkeling van geneesmiddelen.